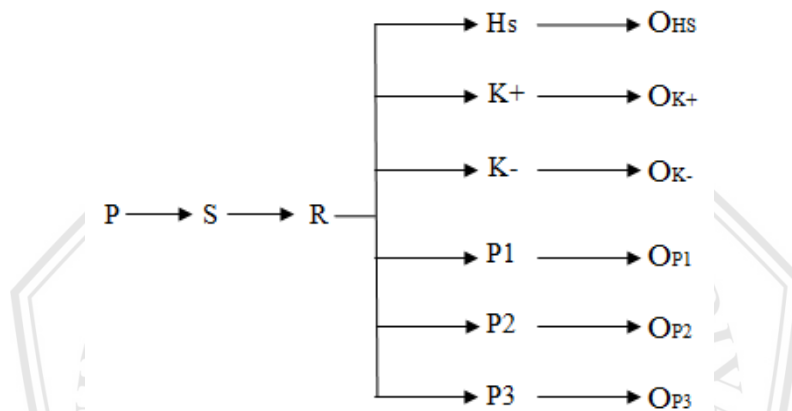


BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Jenis Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan merupakan penelitian *true experimental* dengan menggunakan metode *the post test only control group design* dimana sampel di pilih secara acak dan dibagi menjadi 6 kelompok, yaitu terdiri dari 3 kelompok kontrol, yaitu kontrol positif (K+), kontrol negatif (K-), kontrol hewan sehat (HS), dan 3 kelompok uji yaitu P1, P2, dan P3.



Gambar 4. 1 Rancangan Metode The Post Test Only Control Grup Design

Keterangan :

- P : Populasi
- S : Sampel
- R : Randomisasi
- Hs : Hewan sehat diberi pakan standart selama penelitian
- K₊ : Perlakuan kelompok kontrol positif diberi pakan standart + terapi simvastatin 0,18 mg/200g BB tikus + terapi glibenklamid 0,09 mg/200g
- K₋ : Perlakuan kelompok kontrol negatif diberi pakan standart + aquadest
- P₁ : Perlakuan kelompok uji diberi Kombinasi ekstrak etanol daun mangga arumanis 125mg/kg BB dan perasan buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench 0,36ml/200g BB

- P₂ : Perlakuan kelompok uji diberi kombinasi ekstrak etanol daun mangga arumanis 250mg/kg BB dan perasan buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench 0,36ml/200g BB
- P₃ : Perlakuan kelompok uji diberi kombinasi ekstrak etanol daun mangga arumanis 500mg/kg BB dan perasan buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench 0,36ml/200g BB
- O_S : Kadar HDL pada kelompok hewan sehat
- O_{K+} : Kadar HDL pada kelompok kontrol positif
- O_{K-} : Kadar HDL pada kelompok kontrol negative
- O_{P1} : Kadar HDL pada kelompok perlakuan 1
- O_{P2} : Kadar HDL pada kelompok perlakuan 2
- O_{P3} : Kadar HDL pada kelompok perlakuan 3

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Pengambilan daun mangga arumanis dilakukan di Kediri. Sedangkan penelitian dilakukan di Laboratorium Sintesa Jurusan Farmasi, Fakultas Ilmu Kesehatan, Universitas Muhammadiyah Malang. Kemudian dilanjutkan tahap pembedahaan dan pengambilan sampel darah dilakukan di Laboratorium Farmakologi Fakultas Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Malang. Selanjutnya untuk pengukuran kadar HDL dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Waktu pelaksanaan kegiatan pada bulan Februari-April 2018.

4.3 Populasi dan Sampel

4.3.1 Populasi

Populasi sampel dalam penelitian ini adalah menggunakan tikus putih jantan galur wistar *Rattus norvegicus* dengan berat badan 150-200 g usia 2-3 bulan sebagai hewan coba. Tikus yang digunakan adalah tikus sehat yang ditandai dengan perilaku normal dan memiliki nafsu makan yang baik serta diadaptasi selama 7 hari untuk menyesuaikan dengan kondisi lingkungan dilaboratorium sebagai hewan coba.

4.3.2 Sampel dan Besar Sampel

Jumlah sampel (hewan coba) yang diperlukan pada penelitian ini menggunakan rumus (Pusdatin, Kemkes RI):

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan :

t = banyak kelompok perlakuan

r = jumlah replikasi (besar sampel)

Pada penelitian ini dilakukan 6 kelompok perlakuan, maka :

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$(5)(r-1) \geq 15$$

$$5r - 5 \geq 15$$

$$5r \geq 20$$

$$r \geq 4$$

Berdasarkan perhitungan di atas, maka besar sampel yang diperlukan untuk masing-masing kelompok perlakuan adalah minimal 4 ekor tikus. Pada penelitian ini, jumlah tikus yang digunakan untuk 6 kelompok perlakuan yaitu masing-masing sebanyak 4 ekor tikus. Tikus sebanyak 4 ekor pada masing-masing kelompok ditempatkan pada kandang berukuran $\pm 17,5 \times 23,75 \times 17,5$ cm dalam kondisi terawat dan bebas dari polutan dan kebisingan. Suhu yang diatur pada $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ dan relatif kelembaban udara 50-60% dengan 12\12 jam. Siklus terang gelap (ada pertukaran gelap dan terang setiap 12 jam). Makanan dan minuman tikus yang disediakan *ad-libitum*. Berat tikus diukur setiap minggu untuk semua percobaan (Badkook, 2013).

4.3.2.1 Kriteria Inklusi

Tikus : Wistar galur murni

Tikus : Sehat dan aktif

Umur tikus : 2-3 bulan

Berat tikus : 150 mg-200mg

Jenis kelamin : Jantan

4.3.2.2 Kriteria Eksklusi

Tikus sakit selama aklimatisasi

Tikus dengan kelainan anatomi.

4.4 Variabel Penelitian

Variabel yang dapat diamati pada penelitian ini yaitu :

1. Variabel bebas :

P1 : Kombinasi ekstrak etanol daun mangga arumanis 125mg/kg BB dan perasan buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench 0,36ml/200g BB selama 30 hari.

P2 : Kombinasi ekstrak etanol daun mangga arumanis 250mg/kg BB dan perasan buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench 0,36ml/200g BB selama 30 hari.

P3 : Kombinasi ekstrak etanol daun mangga arumanis 500mg/kg BB dan perasan buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench 0,36ml/200g BB selama 30 hari.

2. Variabel tergantung :

Kadar HDL.

3. Variabel kontrol :

Tikus putih (*Rattus norvegicus*) diabetes.

4. Variabel pengganggu :

a. Dapat dikendalikan

Jenis kelamin, umur, faktor hormonal, makanan, minuman, kondisi (*stress*).

b. Tidak dapat dikendalikan

Penyakit hati, penyakit pankreas.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Alat

1. Timbangan untuk menimbang berat badan tikus
2. Timbangan untuk menimbang Ekstrak Etanol Daun Mangga Arumanis
3. Kandang tikus beserta perlengkapan untuk pemberian makan untuk tikus
4. Botol air
5. Gelas ukur

6. Erlenmeyer
7. Beaker glass
8. Batang pengaduk
9. Corong gelas
10. Cawan porselin
11. Kertas saring
12. Alumunium foil
13. Sonde
14. Sduit
15. Kapas
16. Alkohol swab
17. Spektrofotometer
18. Mortir stemper
19. Jarum hematocrit

4.5.2 Bahan

1. Hewan percobaan tikus putih (*Rattus norvegicus*)
2. Daun Mangga Arumanis (*Mangifera indica* L.)
3. Buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench (*Abelmoschus esculentus* L. Moench)
4. Aqua destilata
5. Aloksan
6. Nipagin
7. Gula jagung
8. Essence mangga
9. Pakan standart/pellet
10. Glibenklamid
11. Simvastatin

4.6 Pengumpulan Data

4.6.1 Persiapan Hewan Coba

Pada penelitian ini sampel atau hewan coba yang di gunakan adalah tikus putih jantan galur *wistar* dengan bobot 150-200 g berusia 2-3 bulan. Sampel di

ambil secara acak dan termasuk jenis *random sampling (probability sampling)* dimana tiap unit atau individu dalam suatu populasi memiliki probabilitas yang sama untuk di jadikan sampel. Berdasarkan protokol yang disahkan oleh *The Committee for the Purpose of Control and Supervision of Experiments on Animal (CPCSEA)*, hewan coba di pelihara pada kondisi lingkungan yang standar (22-28°C, ada pertukaran gelap terang setiap 12 jam) dan di beri makan dengan pakan standar dan air *ad libitum*. Hewan coba di adaptasi dengan menempatkannya pada kandang selama 7 hari terlebih dahulu sebelum penelitian. Setelah masa adaptasi hewan coba dipindahkan untuk masing-masing kelompok percobaan dan diberi tanda pada bagian ekor menggunakan spidol untuk membedakan antara tikus satu dengan lainnya, kemudian dilakukan induksi diabetes. Dilakukan penimbangan berat badan tikus diakhir minggu pada semua kelompok perlakuan untuk melihat adanya pengaruh perbedaan perlakuan.

4.6.2 Induksi Aloksan

Hewan uji sebelum diinduksi aloksan, dipuaskan terlebih dahulu selama 18 jam namun tetap diberikan air minum (Etuk, 2010). Hal ini dikarenakan hewan uji yang dipuaskan lebih rentan mengalami hiperglikemia dibanding hewan uji yang tidak dipuaskan. Setelah itu larutan aloksan monohidrat disuntikkan secara intraperitoneal dengan dosis 150mg/Kg BB (Zhang *et al*, 2006 ; Etuk, 2010) tikus pada kelompok II (kontrol positif), kelompok III (kontrol perlakuan), kelompok IV (kontrol negatif) yang masing-masing terdiri dari 4 hewan uji.

Tikus diabetes setelah penyuntikkan diberi makan dan minum seperti biasa. Tikus diabetes dinilai dengan mengukur kadar glukosa plasma non-puasa setelah 72 jam dari injeksi aloksan. Pemberian aloksan dilakukan sebanyak satu kali (Etuk, 2010).

4.6.3 Prosedur Ekstraksi Daun *Mangifera indica* L. var. *arumanis*

Dilakukan ekstraksi dari simplisia *Mangifera indica* L. var *arumanis* sebanyak 300 gram dengan pelarut etanol 95% sebanyak 3 L. Karena bersifat semipolar sehingga etanol 95% dapat digunakan sebagai pelarut untuk menarik senyawa yang diinginkan yaitu flavonoid. Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi

menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Simplisia daun kering cacahan yang telah di haluskan sebanyak 300 gram di rendam di dalam bejana dengan etanol 96% sebanyak 3 L dan dibiarkan selama 4 jam. Hasil rendaman kemudian dilakukan pengadukan selama 4 jam dan di saring dengan corong buchner. Residu hasil penyaringan di rendam kembali dengan etanol 96% sebanyak 1,5 L dengan perbandingan kedua (1 : 5) dan dibiarkan 24 jam kemudian disaring dengan cara yang sama. Proses ini di ulang 3 kali hingga di peroleh ekstrak dengan konsistensi yang kental. Ekstrak yang terkumpul dari rotavapour di masukkan ke dalam oven pada suhu 40-80⁰ (Liga, 2008).

4.6.4 Pembuatan Perasan Buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench

Berdasarkan penelitian (Hargono dkk, 2010 ; Kusuma dkk, 2011) 30 gram buah okra segar dan 20 ml air dapat menghasilkan 40 ml filtrat dengan menggunakan metode panyaringan dengan kain.

4.6.5 Penentuan Konsentrasi Perasan Buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench

Secara empiris, konsumsi okra pada manusia yang dapat dikonsumsi yaitu sebesar 20 g setiap harinya. $20 \text{ g} \times 0,018 \text{ (Ghosh, 1971)} = 0,36 \text{ gram}$. 30 gram menghasilkan 40 ml filtrat, maka 0,36 gram akan dikonversikan dalam 200 g dalam 200 ml pada penelitian ini sehingga dihasilkan dosis 0,36 ml/200g BB (Fauziana, 2016).

4.6.6 Pemberian Bahan Uji

Tikus yang sudah mengalami kondisi diabetes dibagi menjadi 6 kelompok perlakuan, masing-masing terdiri dari 4 ekor tikus :

1. Tikus diadaptasi selama 7 hari dengan diberi pakan standar selama 7 hari (minggu pertama).
2. Tikus sebanyak 4 ekor sebagai kontrol hewan sehat, di beri pakan standar selama penelitian.
3. Tikus sebanyak 4 ekor sebagai kontrol negatif (K-), yaitu tikus diabetes mellitus diberi diberi pakan standar + aquadest

4. Tikus sebanyak 4 ekor sebagai kontrol positif (K+), yaitu tikus diabetes Mellitus diberi pakan standar + terapi simvastatin 0,18 mg/200 g BB + terapi glibenklamid 0,09 mg/200g BB selama 30 hari.
5. Tikus sebanyak 4 ekor sebagai kelompok perlakuan dosis 1 (P1), yaitu tikus diabetes mellitus diberi kombinasi ekstrak etanol daun *Mangifera indica* var arumanis 125mg/kg BB dan perasan buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench 0,36ml/200g BB selama 30 hari.
6. Tikus sebanyak 4 ekor sebagai kelompok perlakuan dosis 2 (P2), yaitu tikus diabetes mellitus diberi kombinasi ekstrak etanol daun *Mangifera indica* var arumanis 250mg/kg BB dan perasan buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench 0,36ml/200g BB selama 30 hari.
7. Tikus sebanyak 4 ekor sebagai kelompok perlakuan dosis 3 (P3), yaitu tikus diabetes mellitus diberi kombinasi ekstrak etanol daun *Mangifera indica* var arumanis 500mg/kg BB dan perasan buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench 0,36ml/200g BB selama 30 hari.

4.6.7 Pengukuran Kadar HDL

4.6.7.1 Pengambilan Darah Hari ke 3 (72 jam) setelah Induksi Aloksan

Tikus dibersihkan bagian ekor sebelum pengambilan darah dengan alkohol 70%. Darah diambil melalui ujung ekor, dimana ujung ekor tikus ditoreh dengan menggunakan pisau bedah kecil hingga membentuk sayatan yang dalam dan diukur kadar gula darah dengan alat glukometer *Easy Touch GCU* dengan teknologi *electrode-based biosensor*. Caranya dengan setetes darah tikus yang berasal dari ujung ekor ditetaskan pada strip glukosa yang telah dimasukkan dalam glukometer. Selama 10 detik ditunggu untuk menunggu hasil pembacaan konsentrasi glukosa darah pada glukometer. Nilai yang tertera pada glukometer merupakan nilai konsentrasi glukosa darah dengan satuan mg/dL.

4.6.7.2 Pengambilan Darah Hari ke 31 setelah Pemberian Bahan Uji

Pada akhir masa percobaan tikus dipuasakan selama 12 jam sebelum pengambilan darah, tikus dianestesi terlebih dahulu menggunakan kloroform secara inhalasi pada anesthesia chamber (Fahrimal, 2014). Pengambilan darah menggunakan jarum ukuran 22 G dengan *syringe* 5 mL. Pengambilan darah tikus

dilakukan dengan *thoracotomy* (Paulose, 1987; Yoburn, 1984), kemudian melalui ventrikel secara perlahan darah diambil (3 mL) untuk menghindari terjadi kolaps jantung (Fahrimal, 2014; Paulose, 1987; Yoburn, 1984). Darah ditampung pada BD vacutainer, kemudian disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10-20 menit (Turchiano, 2013).

Serum sebanyak 200 µl ditambah µl reagen presipitan dimasukkan kedalam sentrifuge, mencampurnya baik-baik, kemudian di sentrifuge dengan kecepatan 2500g selama 20 menit. Supernatan dipakai untuk pemeriksaan kadar kolesterol HDL. Pengukuran kadar kolesterol HDL yaitu supernatan dan pereaksi kolesterol dicampur baik-baik, didiamkan pada suhu kamar selama 10 menit atau pada suhu 37°C selama 5 menit. Kemudian dibaca absorbansinya pada panjang gelombang 500 nm dengan titik nol blanko. Dengan rumus perhitungan :

$$\text{Kadar kolesterol HDL} = \text{Absorbansi/Absorbansi standar} \times (\text{standar})$$

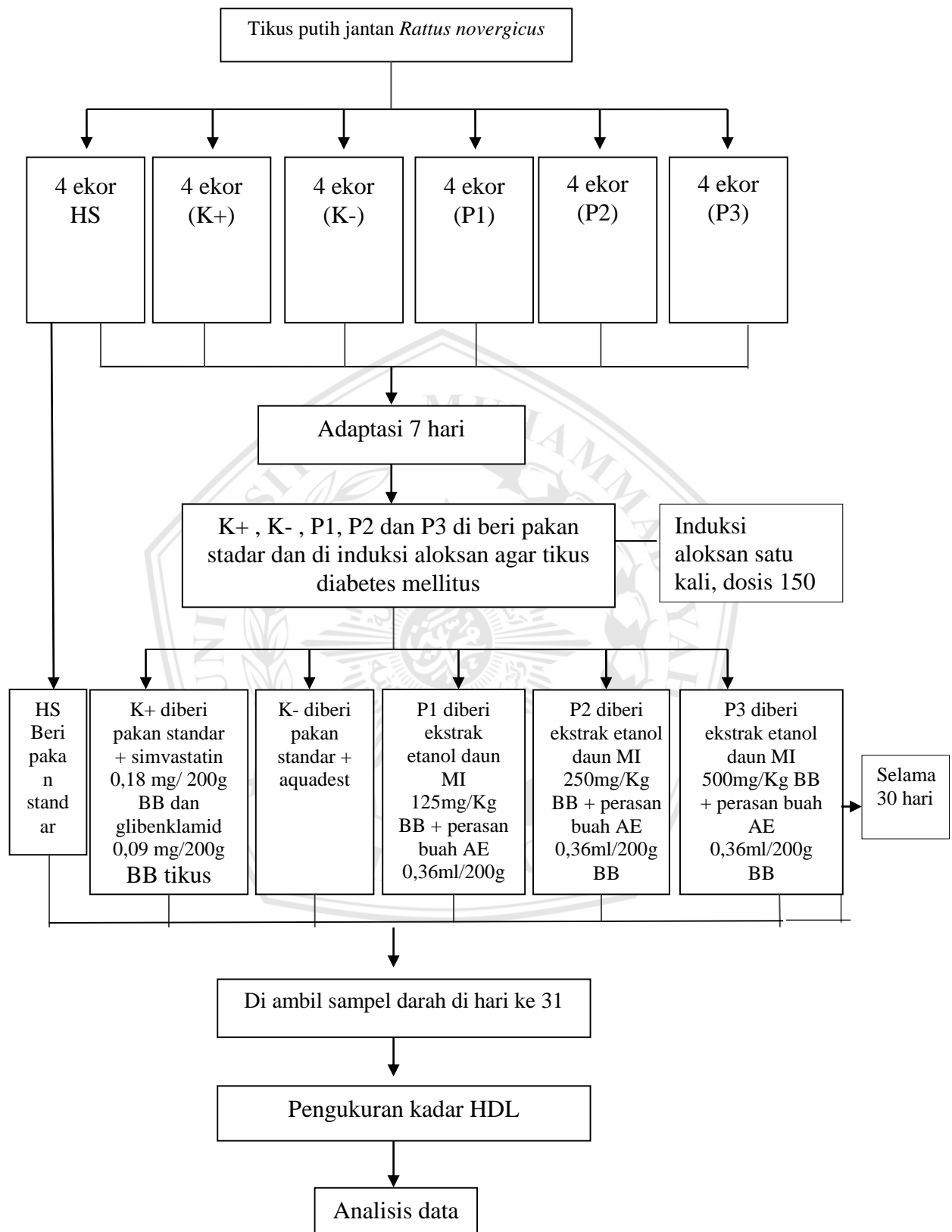
(Fatmawati, 2008).

4.7 Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini yaitu dengan menggunakan metode *One Way ANOVA* Uji homogenitas dan uji *Post Hoc* LSD dikelola menggunakan *software* SPSS (*Statistic Program for Social Science*) 16 for windows.

1. Analisis varian dimana terdapat variabel numerik lebih dari dua kelompok, dalam penelitian ini data yang dianalisis yaitu tiga macam dosis kombinasi ekstrak etanol daun *Mangifera indica* dan perasann buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench pada *Rattus novergicus* diabetes (P1, P2, dan P3). Sebelum pengolahan data harus di pastikan bahwa data yang di peroleh harus (*inferensial*). Data yang bersifat homogen memiliki signifikansi $p > 0,05$.
2. Uji ANOVA dilakukan untuk mengetahui seberapa besar pengaruh kombinasi ekstrak etanol daun *Mangifera indica* dan perasan buah *Abelmoschus esculentus* L. Moench terhadap kenaikan kadar HDL. Hasil uji ANOVA dikatakan ada pengaruh yang sangat bermakna jika nilai signifikan $p < 0,05$. Uji *Post Hoc* LSD dilakukan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan antar kelompok uji.

4.8 Alur Penelitian



Gambar 4. 2 Bagan Alur Penelitian

Keterangan :

HS : Hewan sehat

K+ : Kontrol positif

K- : Kontrol negative

MI : *Mangifera indica* L. var arumanis

AE : *Abelmoschus esculentus* L. Moench

P1 : Kelompok perlakuan 1

P2 : Kelompok perlakuan 2

P3 : Kelompok perlakuan

